Iranian Journal of Field Crops Research
Vol. 16, No. 2, Summer. 2018, p. 477-491

نشریه پژوهشهای زراعی ایران
جلد ۱۶، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۷، ص. ۴۹۱-۴۷۷

مصرف خاکی نانوکایتوزان بر خصوصیات رویشی و فیزیولوژیکی گیاه خارمریم (*Silybum marianum*) تحت تنش شوری

سارا صفی خانی[۱]- کورس خوشبخت[۲*]- محمد رضا چایی چی[۳]- عباس امینی[٤]- بابک متشرع زاده[٥]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۶/۱۵
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۲/۱۹

چکیده

تنش شوری از عوامل مؤثر و مخرب در رشد گیاه و فعالیت‌های فیزیولوژیک آن محسوب می‌شود. به‌منظور توسعه کشت محصولات زراعی در مناطق شور، کاربرد تحریک‌کننده‌های زیستی همچون کایتوزان که قادر به کاهش اثرات مخرب تنش شوری باشند اهمیت زیادی دارد. به منظور بررسی کاربرد نانو کایتوزان روی تعدیل تنش شوری بر صفات رویشی و فیزیولوژیک گیاه دارویی خارمریم، آزمایشی در سال زراعی ۹۶- ۱۳۹۵ در گلخانه پژوهشی-تحقیقاتی دانشگاه تهران واقع در کرج انجام شد. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار انجام شد. عامل اول سطوح مختلف شوری (شاهد (آب معمولی شهری با شوری ۱/۲)، ۴، ۸ و ۱۲ dSm^{-1}) و عامل دوم کاربرد سطوح مختلف نانو کایتوزان (صفر (بدون کاربرد)، ۰/۰۱، ۰/۰۵ و ۰/۱ درصد) به‌صورت خاک مصرف بود. نتایج آزمایش حاکی از تأثیر معنی‌دار شوری بر تمام صفات رویشی، فیزیولوژیک و یونی مورد مطالعه در سطح احتمال یک درصد بود. مقایسه میانگین تیمارهای کایتوزان نشان داد بیشترین زیست‌توده کل، شاخص سطح برگ، محتوای رطوبت نسبی، شاخص پایداری غشا سلولی از غلظت ۰/۰۵ درصد و بیشترین کارایی فتوسیستم II از غلظت ۰/۰۱ درصد حاصل شد. کاربرد کایتوزان با غلظت ۰/۰۵ درصد در سطح شوری ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر منجر به کاهش ۱۰/۴ درصدی مقدار سدیم شاخساره و کاهش ۱۶/۵ درصدی نسبت سدیم به پتاسیم در شاخساره در مقایسه با عدم کاربرد کایتوزان شد. در شرایط شوری ۴ دسی زیمنس بر متر، بالاترین مقدار زیست‌توده کل گیاه از کاربرد ۰/۰۱ درصد کایتوزان به‌دست آمد که در مقایسه با عدم کاربرد کایتوزان در همین سطح شوری افزایشی معادل ۲۱/۶ درصد داشت ($P \leq ۰/۰۱$). با توجه به نتایج آزمایش، می‌توان کاربرد نانو کایتوزان با غلظت ۰/۰۱ درصد را به‌عنوان یک تعدیل‌کننده تنش شوری در کشت گیاه خارمریم معرفی نمود.

واژه‌های کلیدی: آب شور، خصوصیات یونی، زیست توده کل، عناصر معدنی، گیاه دارویی، محتوای رطوبت نسبی

مقدمه

خارمریم (*Silybum marianum*) یک گیاه زراعی-دارویی است که به‌عنوان یک علف هرز سمج نیز شناخته شده است (Kahn *et al.*, 2009). گیاه خارمریم بومی اقلیم مدیترانه‌ای بوده که در سراسر جهان گسترش یافته است. این گیاه در کناره جاده‌ها و زمین‌های بایر و مزارع غلات رشد می‌کند و از آن برای درمان ناراحتی‌های کبدی، چربی خون، دیابت و سرطان استفاده می‌شود. از ترکیبات مهم دانه این گیاه می‌توان به سلیمارین، فلاوونویدها (تاکسیفولین)، اسید چرب و پلی‌فنل‌ها اشاره کرد (Ramasamy and Agarwal, 2008).

کشور ایران در منطقه‌ای خشک و نیمه‌خشک واقع شده است و تنش شوری در مناطق خشک و نیمه‌خشک یکی از تنش‌های مهم است که اثرات محدودکننده شدیدی بر رشد و نمو گیاهان می‌گذارد (Koca *et al.*, 2007). تقریباً بیش از نیمی از تمامی آب‌های زیرزمینی که در نواحی خشک و نیمه‌خشک برای آبیاری محصولات

۱- دانشجوی دکترای کشاورزی بوم‌شناختی، دانشگاه شهید بهشتی، پژوهشکده علوم محیطی، تهران، ایران
۲- دانشیار، پژوهشکده علوم محیطی، دانشگاه شهید بهشتی، تهران
۳- استاد بازنشسته دانشگاه تهران، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی کرج و استاد دانشگاه ایالتی کالیفرنیا
۴- دانشیار، دانشگاه سیدنی غربی
۵- دانشیار، گروه علوم و مهندسی خاک دانشکده مهندسی و فناوری کشاورزی دانشگاه تهران
(*- نویسنده مسئول: Email: kkhoshbakht@yahoo.com)
DOI: 10.22067/gsc.v16i2.67288

کشاورزی به‌کار می‌روند با مشکل شوری مواجه بوده و این امر در شور شدن خاک‌ها و کاهش تولید بسیاری از محصولات کشاورزی نقش دارد (Dorais *et al.*, 2001). این تنش سبب سخت‌تر شدن خاک و در نتیجه ایجاد مشکل برای جذب آب توسط ریشه‌ها می‌شود. همچنین غلظت‌های بالای نمک در درون گیاه ممکن است اثرات سمی در گیاه داشته باشد (Geilfus *et al.*, 2010).

تنش شوری بر برخی فرآیندهای متابولیک اصلی از قبیل فتوسنتز، سنتز پروتئین و سوخت و ساز چربی‌ها و ATP تأثیرگذار است (Parida and Das, 2005). این نوع تنش از طریق دو فرآیند اسمزی (کم‌آبی سلولی) و سمیت (تجمع یون‌ها در سلول‌های گیاه)، با اختلال در رشد، تعادل یونی، فتوسنتز و تثبیت نیتروژن، در میان سایر فرآیندهای کلیدی فیزیولوژیک تأثیرگذار است (Parida and Das, 2005).

در مطالعه‌ای روی تأثیر تنش‌های شوری و خشکی بر خصوصیات جوانه‌زنی بذر خارمریم محققین بیان داشتند که با افزایش تنش‌های شوری و خشکی، طول و وزن خشک ریشه‌چه و ساقه‌چه کاهش پیدا کرد (Yazdani Buick *et al.*, 2010). نتایج پژوهشی دیگری در خارمریم نشان داد که در مقایسه با گیاهان شاهد، گیاهان در تنش شوری تا ۳ دسی زیمنس بر متر، شوری را تحمل کردند اما تعداد کاپیتول در گیاه، قطر کاپیتول و ساقه اصلی و عملکرد بذر و اجزای عملکرد در شوری‌های بالاتر از ۳ دسی‌زیمنس بر متر کاهش یافت. مقدار روغن بذر نیز در شوری بالاتر از ۳ دسی‌زیمنس بر متر اندکی کاهش یافت (Ghavami *et al.*, 2011). نتایج پژوهش دیگر نشان داده است که با تشدید شوری میزان فعالیت آنزیم آلفا آمیلاز و پراکسیداز بذور در روزهای مختلف کاهش یافت به‌طوری‌که کمترین میزان صفات اندازه‌گیری شده مربوط به سطح ۲۵۰ میلی‌مولار شوری و بیشترین مربوط به شاهد بود (Masomy Zvaryan *et al.*, 2013). در آزمایشی روی لوبیا سودانی (*Cajanus cajan* L.) با اعمال شوری، مشاهده شد که با افزایش سطح شوری، وزن تر ریشه هر سه رقم کاهش یافت (Waheed *et al.*, 2006). رشد ریشه در مقایسه با رشد بخش هوایی کمتر تحت تأثیر شوری می‌باشد. ولی ممکن است شوری موجب تغییرات مورفولوژیک و آناتومیک در ریشه تعدادی از گونه‌ها شود (Poljakoff and Lerner, 1994).

استفاده از محرک‌های زیستی یکی از راهکارهای کاهش اثرات مخرب تنش‌های زیستی و غیرزیستی و افزایش عملکرد و کیفیت محصول است. از ترکیباتی که مکانیسم‌های دفاعی گیاه در برابر تنش‌ها را القا می‌کنند می‌توان به کایتوزان اشاره کرد (Amiri *et al.*, 2016). کایتوزان از ترکیبات اصلی دیواره بدن سخت‌پوستان تهیه شده و یکی از محرک‌های زیستی است که به منظور کاهش اثرات منفی تنش‌های غیرزنده اعم از شوری و خشکی و افزایش عملکرد و کیفیت محصول در زمینه کشاورزی کاربرد دارد (Amiri *et al.*, 2016). افزایش وزن خشک اندام هوایی و ریشه، جوانه‌زنی، شاخص سطح برگ و میزان کلروفیل نیز در گیاهان ذرت (*Zea mays*) و لوبیا (*Phasaeolus vulgaris* L.) تحت تأثیر کایتوزان گزارش شده است (Amiri *et al.*, 2016). از این ترکیب به صورت بذرمال و محلول‌پاشی به استفاده شده و در فرآیند مقابله با تنش‌های زنده و غیر زنده بوده است (Rabea *et al.*, 2003; Hadrami *et al.*, 2010). کاربرد کایتوزان کارایی فتوسیستم II، میزان پراکندگی و توسعه ریشه درخت انگور را تحت تنش خشکی افزایش داد (Gornik *et al.*, 2008). همچنین محققان گزارش کردند که کایتوزان در پاسخ گیاهان به تنش‌های محیطی اعم از تنش خشکی و شوری نقش تعدیل‌کنندگی ایفا کرد (Dzung *et al.*, 2011; Ruan and Xue, 2002).

در مطالعات دیگری در زمینه کاربرد خاک مصرف کایتوزان تأثیر افزایشی کایتوزان روی جوانه‌زنی، رشد و گلدهی چندین گیاه زینتی (Ohta *et al.*, 2004) و طول ساقه، قطر ساقه، وزن گل و تعداد گل گیاه *Eustoma grandiforum* (Ohta *et al.*, 2001) گزارش شده است. تحقیقات دیگر حاکی از آن است که گیاهان تیمار شده با کایتوزان می‌توانند آسیب‌پذیری کمتری نسبت به تنش‌های ناشی از شرایط نامساعد مانند خشکی و شوری هستند (Jabeen and Ahmad, 2013; Pongprayoon *et al.*, 2013).

در این تحقیق اثر کاربرد خاک مصرف کایتوزان بر تعدیل اثرات مخرب تنش شوری روی صفات رویشی، فیزیولوژیک و تغییرات یونی گیاه دارویی خارمریم، بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

این تحقیق در سال زراعی ۹۶-۱۳۹۵ در گلخانه تحقیقاتی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران در کرج اجرا شد. در این آزمایش، گیاه خارمریم (*Silybum marianum* L. Gaertn) رقم مجارستانی (Budakalaszi) مورد بررسی قرار گرفت. بذر رقم مجاری از شرکت پاکان بذر اصفهان تهیه شد. بذر مورد استفاده دارای قوه نامیه ۸۰ درصد، خلوص فیزیکی ۹۲ درصد، وزن هزاردانه ۲۰/۴ و رنگ قهوه‌ای تیره مایل به سیاه بود. پس از کشت و استقرار گیاهان (مرحله سه تا چهار برگی)، بوته‌های اضافی تنک شده و در هر گلدان پنج گیاهچه نگهداری شد. آزمایش به‌صورت فاکتوریل در قالب طرح پایه بلوک‌های کامل تصادفی با سه تکرار انجام شد.

کشت و آماده‌سازی خارمریم

برای انجام این پژوهش ریشه‌دان‌هایی (Rhizobag) با مش ۶۰ (۲۵۰ میکرون) و حجم یک کیلوگرم خاک تهیه شد و در گلدان‌های هشت کیلویی قرار داده شد و به گلخانه با شرایط یکسان در دمای

روزانه ۲۵ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد و شبانه ۱۸ تا ۲۰ درجه سانتی‌گـراد منتقل شدند.

جدول ۱- مشخصات فیزیکی و شیمیایی خاک مورد استفاده در گلدان‌ها و ریشه‌دان‌ها

Table 1- Physical and chemical properties of soil filled in pots and rhizobags

بافت خاک (لوم) Soil texture (Loam)			ماده آلی Organic matter (٪)	هدایت الکتریکی Electrical conductivity (EC) $dS.m^{-1}$	pH	پتاسیم قابل دسترس Available potassium ($mg\ kg^{-1}$)	فسفر قابل دسترس Available phosphorous ($mg\ kg^{-1}$)	نیتروژن کل Total nitrogen (٪)	ظرفیت زراعی Field capacity (F.C.)	نقطه پژمردگی PWP (%)
شن Sand (٪)	سیلت Silt (%)	رس Clay (٪)								
34.16	43.34	22.5	0.84	1.70	8.0	151	14.1	0.09	22.40	10.42

۱۲ عدد بذر در هر ریشه‌دان درون گلدان کشت شد، بعـد از سـبز شدن بذرها، بوته‌ها در طی چند مرحله تنک گردیده و نهایتاً در داخـل هر گلدان پنج بوته نگهـداری شـد. بـا اسـتفاده از دسـتگاه صـفحات فشاری [1] و بر اساس روش (Klute, 1986) درصد وزنی رطوبت خاک در پتانسـیل‌هـای مختلـف از جملـه ظرفیـت زراعـی ($\theta_{F.C}$) و نقطـه پژمردگی دائم تعیین گردید. حد فاصل درصد حجمی رطوبت در نقطه ظرفیت زراعی و پژمردگی دائم به‌عنوان رطوبت قابل دسترس خـاک[2] در نظر گرفته شد و آبیاری بر اساس آن از ابتدای کاشت بـا آب شـور انجام شد. مشخصـات فیزیکـی و شـیمیایی خـاک مـورد اسـتفاده در گلدان‌ها در جدول ۱ آمده است.

تیمارهای آزمایشی

برای کاربرد نانو ماده کایتوزان به‌صـورت خـاک مصـرف، مقـادیر استفاده از آن (تیمارهای آزمایشی) به‌صورت نسبت‌هایی (درصدی) از مقدار خاک موجود در ریشه‌دان (یک کیلوگرم خـاک خشـک) مشـابه روش (Ohta *et al.*, 2004) اعمال شد. بـه ایـن منظـور مقـدار نـانو کایتوزان در چهار سطح (بر اساس درصد وزن خشک خاک موجـود در ریشه‌دان‌ها) استفاده شد که عبارت بودند از: ۰/۰۱ درصد، ۰/۰۵ درصد و ۰/۱ درصد از یک کیلوگرم خاک خشک موجود در ریشه‌دان و شاهد (بدون استفاده از نانو کایتوزان). نانو کایتوزان از شرکت سیگما آلدریچ با مشخصات (وزن ملکولی بالا، رنگ کرم مایل به سـفید، بـه شـکل پودری، اندازه ذرات ۵۰ نانومتر و درجه چسـبناکی ۲۰۰۰۰-۸۰۰ cps) تهیه شد.

آب شور از ترکیب نمک NaCl و آب شهری با شـوری پایـه ۱/۲ دسی زیمنس بر متر تهیه و به شوری‌های تیماری رسانده شد. آبیاری با آب شـور در کـل دوره داشـت و از زمـان کاشـت بـذر انجـام شـد، تیمارهای آب شور عبارت بودند از: آب شور ۴، ۸ و ۱۲ دسـی‌زیمـنس بر متر و تیمار شاهد (آب معمول شهری). به منظور حصول اطمینان از ثابت بودن میزان شـوری تیمارهـا در خـاک، گلـدان‌هـایی بـا عنـوان تیمارهای حذفی یا اضافی از ابتدای کاشت برای هر تیمار شوری تعبیه شده و با اندازه‌گیری هدایت الکتریکی[3] آنها پس از آبیاری با آب شور، از ثبات EC مورد نظر در تیمار شوری اطمینان حاصل شـد. همچنـین در طول دوره داشت، به منظور جلوگیری از تجمع بیش از حد نمک در پروفیل ریشه و تنش زیاد در گیاه دو مرتبه آبیاری با آب مقطـر انجـام شد. با این روش، علاوه بر اینکه نمک اضافی از زهکش گلدان خـارج شد، شوری در طول دوره داشت در سطح مورد نظـر ثابـت نگهـداری می‌شد. رطوبت خاک گلدان‌ها روزانه از طریق توزین و با آبیاری چه با آب شور و چه با آب مقطر، در حد ۰/۸ ظرفیت زراعـی مزرعـه[4] (FC-۰/۸ FC) در کـل دوره داشـت بـه منظـور جلـوگیری از بـروز تـنش خشکی، حفظ شد. مطالعه صفات رویشی، فیزیولوژیک و یونی ۷۲ روز پس از کاشت، قبل از مرحله گلدهی، در مرحله ۸-۶ برگی انجام شد.

اندازه‌گیری محتوای رطوبت نسبی برگ (RWC)

به منظور اندازه‌گیری آب نسبی برگ، ۷۲ روز بعـد کشـت بـذرها، اقدام به نمونه‌برداری از برگ‌هایی که تازه توسعه خود را کامـل کـرده بودند، شد. دیسک‌های برگ تهیه و وزن تر آن‌هـا بـا تـرازوی دقیـق دیجیتالی تعیین گردید. این نمونه‌هـا بـه مـدت ۱۶ تـا ۱۸ سـاعت در شدت نور کم داخل آب مقطر قرار داده شدند، سپس وزن نمونـه‌هـای برگی در حالت تورژسانس تعیین شد. نهایتاً نمونه‌ها به‌مدت ۴۸ ساعت و در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد در آون خشـک شـدند و وزن خشـک آن‌ها تعیین شد، سپس با استفاده از معادله ۱ میـزان آب نسـبی بـرگ برحسب درصد محاسبه گردید (Merah, 2001):

1- Pressure plate
2- Soil available water
3- Electrical conductivity
4- Field Capacity

(معادله ۱)

$$\text{درصد محتوی رطوبت نسبی برگ} = 100 \times \left(\frac{\text{وزن آماسیده} - \text{وزن خشک}}{(\text{وزن تر} - \text{وزن خشک})}\right)$$

اندازه‌گیری شاخص سطح برگ

۷۲ روز پس از کشت زمانی که گیاه در مرحله ۶-۸ برگی و هنوز در مرحله رویشی قرار داشت، سطح برگ توسط دستگاه سطح برگ‌سنج پرتابل[1] (مدل Cl-202 ساخت شرکت CID آمریکا) و با توجه به سطح گلدان، محاسبه گردید. گیاه خارمریم در حاشیه برگ‌ها و روی ساقه‌های خود، دارای خارهای ریزی است که مانع اندازه‌گیری سطح برگ نشدند.

اندازه‌گیری شاخص پایداری غشا سلولی

از برگ‌های جوان و کامل توسعه‌یافته دیسک‌هایی به قطر یک سانتی‌متر تهیه و در درون فالکون‌های حاوی ۲۰ میلی‌لیتر آب دی‌یونیزه قرار داده شدند. نمونه‌ها به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید، و میزان هدایت الکتریکی (EC1) آن‌ها اندازه‌گیری شد. سپس نمونه‌ها در درون اتوکلاو به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند و پس از آنکه دمای آن‌ها به دمای اتاق رسید برای بار دوم میزان هدایت الکتریکی (EC2) آن‌ها ثبت گردید. سپس با بهره‌گیری از معادله ۲ شاخص پایداری غشا (MSI) محاسبه گردید (Sairam *et al*., 2002).

(معادله ۲)

$$MSI = 1 - \frac{EC_1}{EC_2} \times 100$$

میزان فلورسانس کلروفیل

میزان فلورسانس برگ‌ها همزمان با محتوای رطوبت نسبی، توسط دستگاه قابل حمل فلورومتر (مدل OPTI-SCIENCES – OS-30, U.S.A.) مورد سنجش واقع شد. انتشار فلورسانس از قسمت رویی برگ‌ها مدنظر قرار گرفت. بدین منظور، ابتدا برگ‌های هدف از طریق الصاق گیره‌های مخصوص به مدت یک ساعت در شرایط تاریکی قرار گرفتند و به شرایط تاریکی سازگار شدند. در ادامه تابش پالس ضعیف و نور سفید اشباع توسط دستگاه منجر به برآورد فلورسانس اولیه (Fo) و بیشینه گردی (Krause and Weis, 1991). فلورسانس متغیر (Fv) با کسر Fo از Fm محاسبه شد. نسبت فلورسانس متغیر به بیشینه (Fv/Fm) برآوردی از کارایی جذب انرژی برانگیخته توسط مولکول‌های کلروفیل a واقع در مرکز واکنش فتوسیستم II را به‌دست داد که نمایانگر حداکثر عملکرد کوانتومی PSII می‌باشد (Rizza *et al*., 2001).

1- Portable Leaf Area meter

اندازه‌گیری سدیم و پتاسیم در ریشه و ساقه

جهت اندازه‌گیری غلظت یون‌های سدیم و پتاسیم در ریشه و اندام هوایی ۷۲ روز پس از کشت گلدان‌ها ریشه‌ها از ریشه‌دان خارج و شستشو داده شدند و به همراه قسمت هوایی بریده شده به مدت ۴۸ تا ۷۳ ساعت در آون ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. پس از خشک شدن و پودر کردن آن‌ها، مقدار ۰/۲ گرم از هر نمونه توزین گردید و در کروزه‌های چینی به مدت ۵ ساعت در کوره تحت دمای ۵۸۰ درجه سانتی‌گراد به خاکستر تبدیل و پس از آن با اضافه کردن ۲۰ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۲ نرمال و رساندن حجم آن به ۱۰۰ میلی‌لیتر با آب مقطر، از کاغذ صافی عبور داده شد و محلول حاصل با دستگاه فلیم فتومتر مدل Carl ziess PF5 (Germany) اندازه‌گیری شد و بعد مقدار سدیم و پتاسیم بر اساس منحنی‌های استاندارد بر حسب غلظت در میلیون (ppm) تعیین، و سپس با استفاده از معادله ۳ بر حسب درصد ماده خشک محاسبه شد (Kalra, 1998).

(معادله ۳)

$$\%E = [(C \times D \times V)/106 \times DM] \times 100$$

که E مقدار عنصر مورد نظر، C غلظت عنصر بر حسب میلی‌گرم بر لیتر، D درجه رقت و حجم نهایی عصاره تهیه شده بر حسب میلی‌لیتر و DM وزن خشک نمونه بر حسب گرم می‌باشد و نهایتاً مقدار عنصر بر حسب میلی‌گرم برگرم وزن خشک گزارش شد.

اندازه‌گیری زیست توده کل بوته

به‌منظور مطالعه وزن قسمت‌های هوایی، بوته‌ها کف بر شدند. همچنین به منظور مطالعه زیست توده کل بوته، پس از خارج کردن ریشه‌دان از گلدان‌ها، ریشه‌های موجود در ریشه‌دان‌ها با شستشو خارج شدند به همراه قسمت بالایی گیاه، بعد از خشک کردن در آون با دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و به مدت ۴۸ ساعت توسط ترازوی چهار صفر توزین شد.

تجزیه آماری

پس از آزمون همگنی واریانس‌ها توسط آزمون بارتلت، محاسبات آماری مربوطه با استفاده از نرم‌افزار SAS نسخه ۹/۱ و مقایسه میانگین‌ها از طریق آزمون حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال پنج درصد صورت گرفت. نمودارها با استفاده از نرم‌افزار Excel ترسیم گردید.

نتایج و بحث

زیست‌توده گیاه

نتایج آزمایش نشان داد که تیمار شوری، کایتوزان و اثر متقابل این دو عامل اثر معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد روی

زیست‌توده کل گیاه داشت (جدول ۲). با افزایش مقدار شوری آب آبیاری، مقدار زیست‌توده کاهش یافت. بیشترین زیست توده گیاه (۱/۹۲ گرم) در تیمار شاهد آبیاری و کاربرد ۰/۰۵ درصد کایتوزان به‌دست آمد. در سطوح مختلف شوری آب، کاربرد نانو کایتوزان به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد (بدون نانو کایتوزان) توانست مقدار تولید زیست‌توده کل را افزایش دهد. در شرایط تنش شوری ۴ دسی زیمنس بر متر، بالاترین مقدار زیست توده گیاهی (۱/۷۶ گرم) از کاربرد مقدار ۰/۰۱ درصد نانو کایتوزان نسبت به خاک خشک حاصل شد که افزایش معنی‌داری معادل ۲۱/۶ درصدی را نسبت به عدم کاربرد نانو کایتوزان (شاهد) در همین سطح شوری نشان داد (شکل ۱). این پدیده مبین آن است که کاربرد سطوح بالاتر نانو کایتوزان (۰/۱ و ۰/۰۵ درصد) امتیاز خاصی را نسبت به سطوح پایین آن ایجاد ننموده است. به نظر می‌رسد کاربرد نانو کایتوزان تنش ناشی از کم‌آبی که از تأثیرات ثانویه تنش خشکی است را جبران نموده است.

جدول ۲- تجزیه واریانس صفات رویشی و فیزیولوژیک در گیاه خارمریم

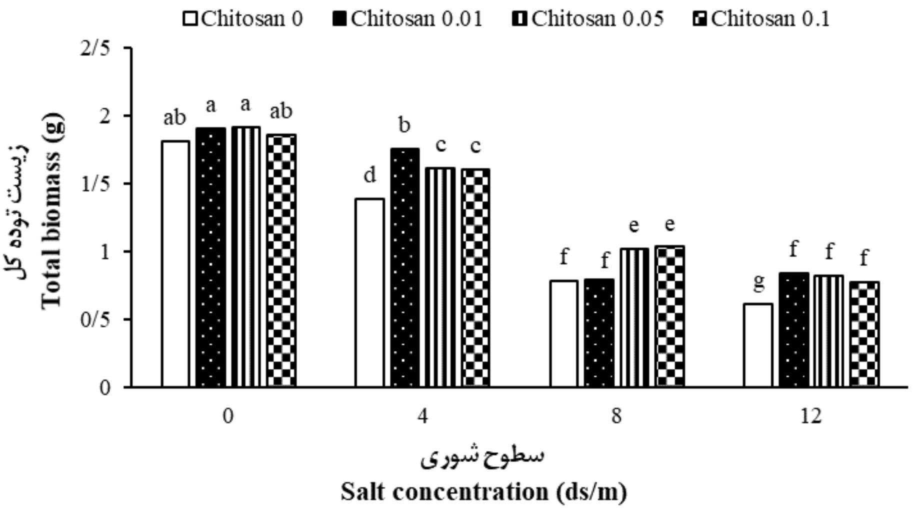
Table 2- Analysis of variance of growth and physiologic traits in milk thistle

منابع تغییرات S.O.V.	درجه آزادی d.f.	زیست توده کل Total biomass	شاخص سطح برگ Leaf area index	محتوای رطوبت نسبی Relative water content	شاخص پایداری غشا سلولی Membrane stability index	کارایی فتوسیستم II Fv/Fm
تکرار Block	2	0.0029	0.0973	5.5493	16.8679	0.0002
تنش شوری Salt stress	3	3.4438**	9.2690**	421.8565**	603.0235**	0.0313**
کایتوزن Chitosan	3	0.0987**	0.8660**	10.1567**	63.2517**	0.0009**
تنش شوری × کایتوزن Salt × Chitosan	9	0.0233**	0.3710**	1.8720	4.2849	0.0002
خطا Error	30	0.0051	0.1015	1.7673	7.9174	0.0002
ضریب تغییرات C.V. (%)	-	5.56	11.61	1.70	5.08	1.85

* و ** : معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد و یک درصد

*and **: Significant at 5% and 1% probability levels.

در مطالعه‌ی کاربرد خاک مصرف کایتوزان بر جوانه‌زنی، رشد و گلدهی چندین گیاه زینتی، گزارش شد که عملکرد کل، وزن تر و خشک گیاه، سرعت و میزان جوانه‌زنی و سطح برگ در تیمار کاربرد خاک مصرف کایتوزان افزایش یافته است (Ohta *et al.*, 2004). در آزمایشی روی ذرت به این نتیجه رسیدند که کاربرد کایتوزان رشد و عملکرد را به‌ترتیب ۲۱ و ۱۷ درصد افزایش داد (Guan *et al.*, 2009). شایان ذکر است افزایش تحریک‌کنندگی رشد و افزایش عملکرد با کاربرد کایتوزان توسط بسیاری از محققین گزارش شده است (Amiri *et al.*, 2016; Mondal *et al.*, 2012). این در حالی است که تا به حال سازوکار عمل کایتوزان روی رشد ناشناخته باقی مانده است. احتمالاً کایتوزان سیگنالی را برای سنتز هورمون‌های گیاهی مانند جیبرلین القا کند و رشد و نمو گیاه را توسط برخی مسیرهای سیگنالینگ مربوط به بیوسنتز اکسین، از طریق مسیر وابسته به تریپتوفان افزایش دهد (Uthairatanakij *et al.*, 2007). گزارشاتی مبنی بر بهبود مقاومت گیاهان به تنش شوری در اثر کاربرد کایتوزان روی گیاهان گلرنگ (*Carthamus tinctorius* L.) و آفتابگردان (*Helianthus annuus* L.) (Jabeen and Ahmad, 2013) وجود دارد که هنوز مکانیزم دقیق نحوه ایجاد مقاومت در آن‌ها بیان نشده است. افزایش کارآیی مصرف آب به میزان ۴۳-۲۶ ٪ بدون کاهش زیست‌توده گیاهی تحت تأثیر کاربرد کایتوزان در گیاه فلفل (*Piper nigrum* L.) گزارش شده است (Bittelli *et al.*, 2001). در نتایجی مطابق پژوهش حاضر، محققین دیگری روی گیاه بامیه (*Abelmoschus esculentum* L.) (Mondal *et al.*, 2012) و باقلا (*Vicia faba* L.) (Sheikh and Almalki, 2009) و گلرنگ (Amiri *et al.*, 2016) به این نتیجه رسیدند که افزایش مصرف کایتوزان باعث افزایش در عملکرد می‌شود.



شکل ۱- بر همکنش تاثیر تنش شوری و کاربرد نانو کایتوزان بر صفت زیست‌توده کل در گیاه خارمریم

اعداد با حروف متفاوت در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد بر اساس آزمون LSD می‌باشند.

Figure 1- Interaction of salinity stress and chitosan application on total biomass in milk thistle

Different letters indicate significant difference at $p \leq 0.05$ based on LSD test.

جدول ۳- مقایسه میانگین صفات رویشی و فیزیویوژیک خارمریم تحت تأثیر تنش شوری و نانو کایتوزان

Table 3- Vegetative and physiologic traits of Milk thistle affected by salt stress and Chitosan

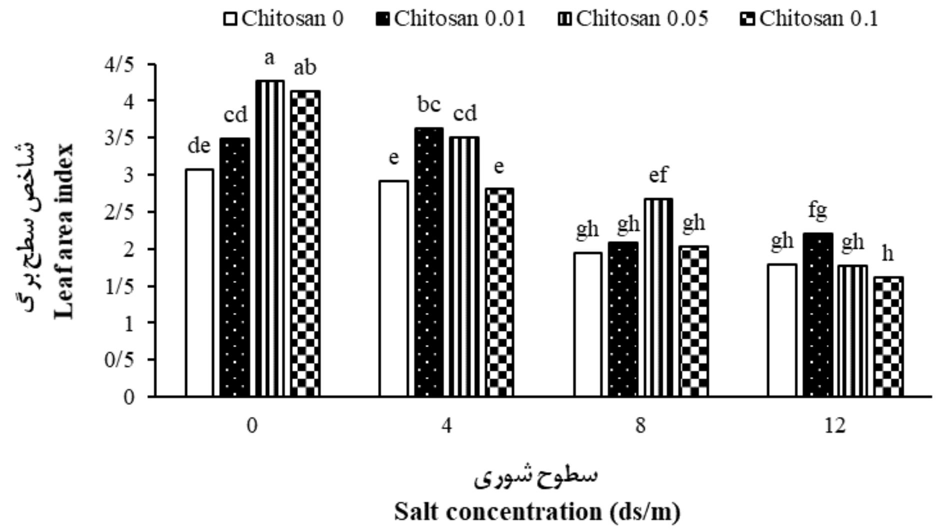
تیمارها **Treatments**	محتوای رطوبت نسبی **Relative water content (%)**	شاخص پایداری غشا سلولی **Membrane stability index (%)**	کارآیی فتوسیستم II **Fv/Fm**
		Salt stress تنش شوری	
0 $dS\ m^{-1}$	83.120	62.730	0.826
4 $dS\ m^{-1}$	82.190	59.100	0.818
8 $dS\ m^{-1}$	76.710	53.200	0.759
12 $dS\ m^{-1}$	70.260	46.540	0.719
		Chitosan کایتوزن	
0 (Control)	77.230	53.120	0.772
0.01 %	78.260	56.590	0.793
0.05 %	79.290	58.010	0.782
0. 1 %	77.510	53.860	0.775
LSD	1.108	2.346	0.012

اعداد با حروف متفاوت در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد بر اساس آزمون LSD می‌باشند.

Different letters indicate significant difference at $p \leq 0.05$ based on LSD test.

شاخص سطح برگ (LAI)

تأثیر شوری، کاربرد کایتوزان و همچنین اثر متقابل این دو عامل اثر معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد روی صفت شاخص سطح برگ داشت (جدول ۲). استفاده از نانو کایتوزان به‌طور کلی در تمامی سطوح آبیاری شاهد (بدون شوری) و تنش شوری موجب افزایش شاخص نسبت سطح برگ در مقایسه با شاهد (بدون کاربرد نانو کایتوزان) شد. کاربرد مقدار ۰/۰۵ درصد نانو کایتوزان اثر خود را به خوبی در افزایش نسبت سطح برگ در تمام سطوح آبیاری اعم از شاهد (بدون شوری) و تیمارهای آب شور نشان داد. در تیمار تنش شوری شدید (۱۲ دسی زیمنس بر متر) استفاده از کایتوزان در سطح ۰/۰۱ درصد اگرچه به لحاظ عددی مقدار شاخص سطح برگ را افزایش داد اما تفاوت معنی‌داری نسبت به شاهد بدون کایتوزان نشان نداد (شکل ۲). به نظر می‌رسد که وقتی تنش شوری به بیش از ۸ دسی‌زیمنس بر متر افزایش می‌یابد، کاربرد نانو کایتوزان نمی‌تواند عامل مؤثری در تعدیل اثرات منفی آن بر خصوصیات رویشی گیاه خارمریم باشد.



شکل ۲- بر همکنش تأثیر تنش شوری و کاربرد نانو کایتوزان بر صفت شاخص سطح برگ در گیاه خارمریم

اعداد با حروف متفاوت در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد بر اساس آزمون LSD می‌باشند.

Figure 2- Interaction of salinity stress and chitosan application on leaf area index in milk thistle

Different letters indicate significant difference at $p \leq 0.05$ based on LSD test.

محتوای رطوبت نسبی (RWC)

شوری اثر معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد روی محتوای رطوبت نسبی برگ داشت (جدول ۲). با افزایش تنش شوری، محتوی رطوبت نسبی برگ از یک روند کاهشی پیروی نمود، به‌طوری‌که کمترین محتوی رطوبت نسبی برگ در تیمار شوری ۱۲ دسی زیمنس بر متر (۷۰/۲۶ درصد) مشاهده شد که نسبت به تیمار آبیاری شاهد (بدون شوری) کاهشی معادل ۱۵/۵۰ درصد را نشان داد. کاربرد کایتوزان اثر معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد روی محتوای رطوبت نسبی برگ داشت (جدول ۲). کاربرد کایتوزان با غلظت ۰/۰۵ درصد موجب شد محتوی رطوبت نسبی به بیشینه مقدار خود (۷۹/۲۹ درصد) برسد که نسبت به شاهد (بدون کاربرد نانو کایتوزان) افزایش معنی‌دار تقریبی معادل ۳ درصد را نشان داد (جدول ۳). در بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف کایتوزان بر جوانه‌زنی و رشد گیاهچه گندم در شرایط تنش خشکی، گزارش شده است که افزایش غلظت کایتوزان منجر به افزایش درصد آب بافت گیاهچه شد (Wei *et al*., 2007). گرچه از لحاظ آماری اختلاف معنی‌داری بین تیمارهای مختلف نانو کایتوزان به لحاظ پتانسیل اسمزی وجود نداشت ولی می‌توان اظهار داشت که با کاربرد کایتوزان، پتانسیل اسمزی نسبت به شاهد افزایش یافت و بافت‌های گیاهی دارای درصد آب بافت گیاهچه‌ای بیشتری بود (Taghipour and Maghsuddi, 2015). با توجه به اینکه بالا بودن محتوای نسبی آب، توانایی گیاهان را برای تنظیم اسمزی و حفظ رشدشان را نشان می‌دهد، به نظر می‌رسد که کایتوزان با افزایش محتوای نسبی آب توانسته رشد گیاه خارمریم را افزایش دهد. زیرا افزایش محتوی رطوبت نسبی شرایط مساعد برای فتوسنتز و نیز تقسیم و توسعه سلولی برگ را فراهم می‌کند که باعث تولید بیشتر مواد فتوسنتزی و در نتیجه افزایش رشد گیاه می‌گردد (Aghighi shahroodi *et al*., 2017).

شاخص پایداری غشا سلولی (Membrane stability index)

تنش شوری اثر معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد روی شاخص پایداری غشا سلولی داشت (جدول ۲). با افزایش تنش شوری، شاخص پایداری غشا سلولی به‌طور معنی‌داری از یک روند کاهشی پیروی نمود به‌طوری‌که حداقل این شاخص در تیمار ۱۲ دسی زیمنس بر متر به مقدار ۴۶/۵۴ درصد مشاهده شد که بیانگر اثرات تخریبی شدید تنش شوری در گیاه در این تیمار می‌باشد. کاربرد کایتوزان اثر معنی‌داری روی شاخص پایداری غشا سلولی داشت (جدول ۲). با افزایش مقدار مصرف نانو کایتوزان شاخص پایداری غشای سلولی از روند خاصی پیروی نکرد ولی بیشترین شاخص پایداری در تیمارهای ۰/۰۱ و ۰/۰۵ درصد مصرف نانو کایتوزان مشاهده شد (جدول ۳).

کارایی فتوسیستم II (Fv/Fm)

کارایی فتوسیستم II در سطح احتمال یک درصد تحت تأثیر تنش شوری قرار گرفت (جدول ۲). بر اساس نتایج به‌دست آمده، با افزایش تنش شوری کارایی فتوسیستم فقط در تنش‌های متوسط و شدید

نسبت به شاهد کاهش معنی‌داری را نشان داد. شایان ذکر است که کمترین مقدار این شاخص در تیمار ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر مشاهده شد (۰/۷۱۹) که به‌طور معنی‌داری نسبت به شاهد (بدون تنش شوری) کاهش نشان داد. کاربرد کایتوزان نیز در سطح احتمال یک درصد اثر معنی‌داری روی کارایی فتوسیستم داشت (جدول ۲). با مصرف کایتوزان شاخص کارایی فتوسیستم II از روند خاصی پیروی نکرد، در حالی که بالاترین مقدار آن (۰/۷۹۳) در کاربرد ۰/۰۱ درصد نانو کایتوزان مشاهده شد (جدول ۳).

محققان در بررسی اثر کایتوزان بر رشد و خصوصیات بیوشیمیایی گلرنگ در شرایط تنش کم‌آبی گزارش کردند که در شرایط بدون تنش اختلاف معنی‌داری بین غلظت‌های مختلف کایتوزان با شاهد برای کارایی فتوسیستم II مشاهده نشد. همچنین کارایی فتوسیستم II (Fv/Fm) و فلورسانس (FM)، در شرایط تنش کم‌آبی کاهش یافتند (Mahdavi *et al.*, 2013). واکنش گیاهان به دامنه وسیعی از تنش‌های زیستی، شیمیایی و محیطی به‌وسیله تغییرات فلورسانس کلروفیل قابل ارزیابی است به‌طوری‌که کاهش نسبت Fv/Fm توسط محققان دیگر هم در شرایط تنش آبی گزارش شده است (Miyashita *et al.*, 2005). مقدار Fv/Fm برگ در هر گیاه نشان‌دهنده‌ی کارایی شیمیایی فتوسیستم II در فتوسنتز است، این کارایی به شدت تحت تأثیر تنش‌های خشکی و به دنبال آن شوری قرار گرفته و با کاهش رطوبت قابل دسترس برای گیاه، این نسبت کاهش می‌یابد که باعث بازدارندگی فتوسنتز نیز می‌شود. در تعدادی از گیاهان گزارش شده که در صورت تداوم دوره تنش خشکی (Fv/Fm) با افزایش مقدار تولید کوانتوم می‌توان خسارت وارده به فتوسیستم II را کاهش داد (Mahdavi *et al.*, 2013). بنابراین به نظر می‌رسد که نانو کایتوزان در شرایط تنش با حفظ نسبت Fv/Fm، اثرات مخرب تنش را بر کارایی فتوسیستم II کاهش می‌دهد.

مقدار یون سدیم در شاخساره

اثر شوری درسطح احتمال یک درصد و اثر متقابل شوری و کاربرد چیتوسان در سطح احتمال پنج درصد اثر معنی‌داری روی سدیم شاخساره گیاه خارمریم داشت (جدول ۴). کاربرد نانو کایتوزان در سطوح تیمارهای آب شور موجب کاهش معنی‌دار مقدار سدیم شاخساره نسبت به شاهد (بدون نانو کایتوزان) شد. که این اثرات به‌ویژه در سطح ۰/۰۱ درصد کاربرد نانو کایتوزان برای تیمار ۴ دسی‌زیمنس بر متر و در سطح ۰/۰۵ درصد آن در تیمار ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر قابل مشاهده بود. همچنین به نظر می‌رسد که استفاده از این ماده در سطح شوری بالای ۸ دسی‌زیمنس (شوری‌های شدید) به خوبی می‌تواند مقدار سدیم موجود در شاخساره را کاهش دهد، به‌طوری که کاربرد ۰/۰۵ درصد نانو کایتوزان در تیمار ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر موجب کاهش ۱۰/۴ درصدی این عنصر نسبت به تیمار شاهد در گیاه شد (شکل ۳).

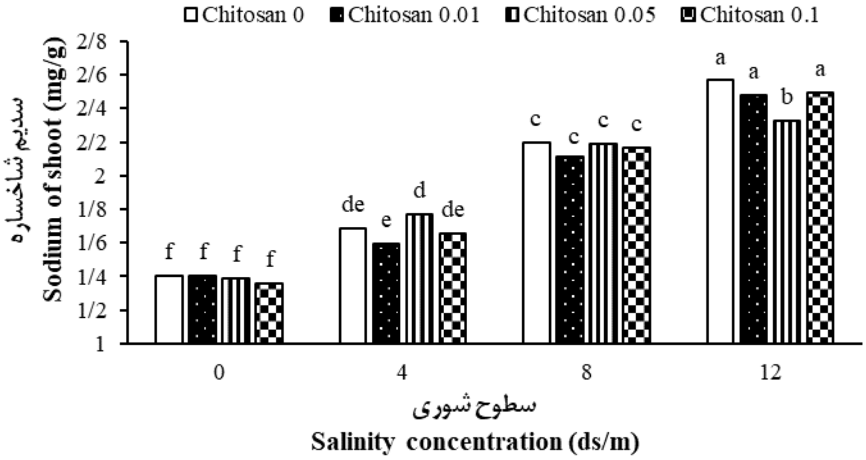
جدول ٤- تجزیه واریانس صفات مربوط به غلظت یون‌ها در گیاه خارمریم

Table 4- Analysis of variance of ionic traits in milk thistle

منابع تغییرات S.O.V.	درجه آزادی d.f	یون سدیم در شاخساره Na^+ in shoot	یون پتاسیم در شاخساره K^+ in shoot	نسبت یون سدیم به پتاسیم در شاخساره Na^+/K^+ in shoot	یون سدیم در ریشه Na^+ in root	یون پتاسیم در ریشه K^+ in root	نسبت یون سدیم به پتاسیم در ریشه Na^+/K^+ in root
تکرار Block	2	0.0211	0.0236	0.0057*	0.0019	0.0004	0.0097
تنش شوری Salt stress	3	2.7989**	0.9549**	0.6924**	1.8541**	0.0853**	8.1879**
کایتوزن Chitosan	3	0.0089	0.0261*	0.0056**	0.0057*	0.0022**	0.0351*
تنش شوری × کایتوزن Salt × Chitosan	9	0.0139*	0.0125	0.0049**	0.0011	0.0006	0.0078
خطا Error	30	0.0051	0.0072	0.0011	0.0019	0.0005	0.008
ضریب تغییرات CV (%)	-	3.70	2.99	4.83	8.48	3.59	10.03

* و **: معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد و یک درصد

*and **: Significant at 5% and 1% probability levels.



شکل ۳- بر همکنش تأثیر تنش شوری و کاربرد نانو کایتوزان بر صفت سدیم شاخساره در گیاه خارمریم

اعداد با حروف متفاوت در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد بر اساس آزمون LSD می‌باشند.

Figure 3- Interaction of salinity stress and chitosan application on sodium in root in milk thistle

Different letters indicate significant difference at $p \leq 0.05$ based on LSD test.

مقدار پتاسیم در شاخساره

شوری در سطح احتمال یک درصد اثر معنی‌داری روی صفت پتاسیم شاخساره داشت (جدول ۴). با افزایش تنش شوری مقدار پتاسیم در شاخساره به‌طور معنی‌داری از یک روند کاهشی پیروی نمود به‌طوری‌که کمترین مقدار پتاسیم (۲/۵۵ میلی‌گرم بر گرم) در تیمار ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر مشاهده شد که کاهشی معادل ۱۹/۳ درصد را نسبت به تیمار شاهد نشان داد. کاربرد کایتوزان اثر معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد روی پتاسیم شاخساره داشت (جدول ۴). به‌طور کلی کاربرد کایتوزان (در سطوح مختلف)، مقدار پتاسیم در شاخساره را نسبت به شاهد (عدم استفاده از کایتوزان) افزایش داد. بالاترین مقدار این عنصر در شاخساره با کاربرد حداقل کایتوزان مصرفی (۰/۰۱ درصد) و به مقدار ۲/۸۹ میلی‌گرم بر گرم حاصل شد (جدول ۵). این پدیده مبین اثرات مثبت مصرف نانو کایتوزان در افزایش نسبی یون پتاسیم در شاخساره می‌باشد که نقش مؤثری را در تعدیل اثرات منفی شوری (به‌خصوص یون سدیم) از طریق کاهش نسبت سدیم به پتاسیم ایفا نماید.

به نظر می‌رسد کاربرد کایتوزان در گیاهان تنش دیده با افزایش غلظت پتاسیم در ساقه سبب پاسخ مناسب این گیاهان در رویارویی با تنش شوری شده است (Mahdavi and Safari, 2015). غلظت پایین سدیم و بالای پتاسیم در سیتوپلاسم برای حفظ فرآیندهای آنزیمی در سیتوپلاسم، لازم و ضروری است (James *et al.*, 2006). هنگامی که گیاهان در معرض تنش شوری قرار می‌گیرند سدیم زیادی را جذب می‌کنند که به تبع آن از جذب پتاسیم جلوگیری به‌عمل می‌آید (Munns, 2003). کاهش پتاسیم در شرایط تنش شوری سبب خسارت به سلول‌ها هم از نظر فیزیولوژی و هم بیوشیمیایی می‌شود و می‌تواند به‌عنوان یکی از دلایل اصلی سمیت شوری مطرح گردد (Shabala *et al.*, 2006). Mahdavi and Safari (2015) در بررسی اثر کایتوزان بر رشد و برخی ویژگی‌های فیزیولوژیک نخود در شرایط تنش شوری گزارش کردند که با افزایش تنش شوری از غلظت پتاسیم ساقه و ریشه کاسته شد، به گونه‌ای که بیشترین درصد متعلق به تیمار بدون تنش و کمترین آن به سطح شوری ۸ دسی‌زیمنس بر متر بود. ایشان گزارش کردند که کاربرد نانو کایتوزان میزان پتاسیم را در ریشه گیاهان تیمار شده نسبت به گیاهان شاهد افزایش، ولی میزان سدیم ریشه را کاهش داد.

نسبت سدیم به پتاسیم در شاخساره

تنش شوری، کاربرد کایتوزان و اثر متقابل این دو عامل اثر معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد روی نسبت سدیم به پتاسیم شاخساره داشت (جدول ۴). استفاده از کایتوزان در تیمار آبیاری شاهد (بدون شوری) و همچنین در سطوح پایین و متوسط تنش شوری (۴ و ۸ دسی‌زیمنس بر متر) نتوانست نسبت مقدار سدیم به پتاسیم شاخساره را نسبت به شاهد (بدون استفاده از نانو کایتوزان) به‌طور معنی‌داری کاهش دهد، اما استفاده از این ماده در تنش شوری شدید (۱۲ دسی‌زیمنس بر متر) به‌خوبی توانست نسبت سدیم به پتاسیم را نسبت به شاهد کاهش دهد و در این راستا کمترین نسبت سدیم به پتاسیم در تیمار ۰/۰۵ درصد کایتوزان حاصل شد. این امر به خوبی اثر کایتوزان را در تعدیل اثر مخرب یون سدیم در تیمار مورد نظر را نشان می‌دهد.

جدول ۵- مقایسه میانگین صفات یونی خارمریم تحت تأثیر تنش شوری و نانو کایتوزان

Table 5- Mean comparisons of ionic traits of milk thistle as affected by salt stress and Chitosan

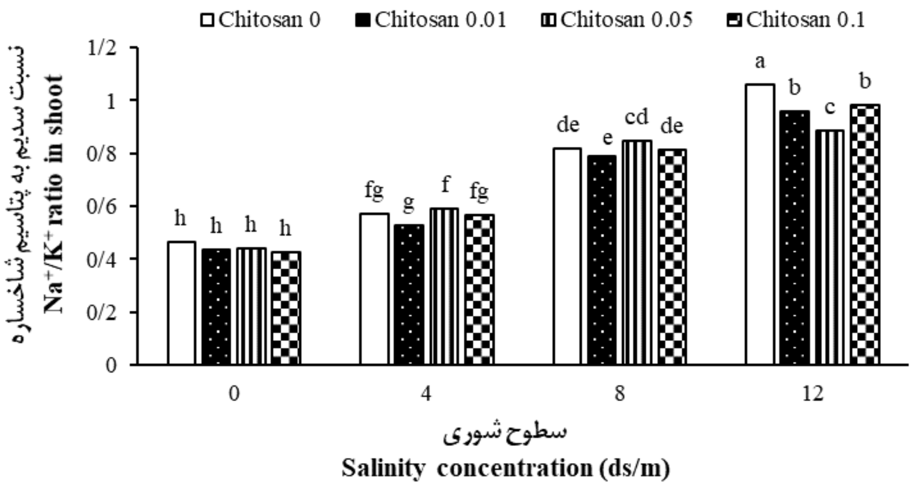
تیمارها Treatments	یون پتاسیم در شاخساره K^+ in shoot (mg g^{-1})	یون سدیم در ریشه Na^+ in root (mg g^{-1})	یون پتاسیم در ریشه K^+ in root (mg g^{-1})	نسبت یون سدیم به پتاسیم در ریشه Na^+/K^+ in root
		تنش شوری **Salt stress**		
0 dS m^{-1}	3.156	0.201	0.686	0.294
4 dS m^{-1}	2.974	0.238	0.670	0.355
8 dS m^{-1}	2.652	0.547	0.575	0.954
12 dS m^{-1}	2.547	1.051	0.507	2.075
		کایتوزن **Chitosan**		
0 control	2.771	0.537	0.595	0.994
0.01 %	2.885	0.502	0.602	0.916
0.05 %	2.843	0.484	0.625	0.865
0. 1 %	2.829	0.512	0.616	0.903
LSD	0.070	0.036	0.018	0.077

اعداد با حروف متفاوت در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد بر اساس آزمون LSD می‌باشند.

Different letters indicate significant difference at $p \leq 0.05$ based on LSD test.

Mahdavi and Safari (2015) در بررسی اثر کایتوزان بر رشد و برخی ویژگی‌های فیزیولوژیک نخود در شرایط تنش شوری گزارش کردند که در شرایط بدون تنش، پیش‌تیمار بذرها با کایتوزان سبب کاهش میزان سدیم ساقه نسبت به شاهد شد. همچنین در شرایط تنش شوری، تیمار کایتوزان سدیم ساقه را نسبت به شاهد کاهش داد.

مصرف کایتوزان اثر معنی‌داری بر میزان سدیم ریشه نداشت. تجمع یون سدیم تغییراتی را در تعادل یونی ایجاد می‌نماید که این عدم تعادل یونی سبب کاهش یا ممانعت از رشد گیاه می‌گردد (Mer *et al.*, 2000). به نظر می‌رسد استفاده از نانو کایتوزان با کاهش میزان سدیم در ساقه، توانسته گیاه را در تحمل به تنش شوری یاری رساند.



شکل ٤- بر همکنش تأثیر تنش شوری و کاربرد نانو کایتوزان بر صفت نسبت سدیم به پتاسیم شاخساره در گیاه خارمریم

اعداد با حروف متفاوت در هر ستون دارای اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال پنج درصد بر اساس آزمون LSD می‌باشند.

Figure 4- Interaction of salinity stress and chitosan application on Na^+/K^+ in root in milk thistle

Different letters indicate significant difference at $p \leq 0.05$ based on LSD test.

مقدار سدیم در ریشه

تنش شوری اثر معنی‌داری در سطح احتمال یک درصد روی مقدار سدیم ریشه داشت (جدول ۴). روی مقدار یون سدیم در ریشه در سطح متوسط و شدید شوری (۸ و ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر) نسبت به شاهد با شدت بیشتری افزایش یافت. مقدار این افزایش در بالاترین سطح تنش شوری (۱۲ دسی‌زیمنس بر متر) به ۱/۰۵ میلی‌گرم بر گرم رسید که نسبت به شاهد بدون شوری غلظتی معادل

۵ برابر را نشان می‌دهد. وقوع این پدیده مبین اثـرات تخریبـی شـدید یون سدیم در این سطح از تیمار شوری می‌باشد. کـاربرد کـایتوزان در سطح احتمال پنج درصد اثر معنی‌داری بر مقدار سـدیم ریشـه داشـت (جدول ۴). کاربرد کایتوزان بـا غلظـت ۰/۰۵ درصـد کمتـرین مقـدار سدیم ریشه (۰/۴۸۴ میلی گرم بر گرم) را کسب کرد. بنابراین کـاربرد کایتوزان در کاهش یون مخرب سدیم در محیط ریشه مؤثر می‌باشـد. این موضوع می‌تواند به تحمل تنش شـوری در محـیط ریشـه کمـک نماید.

مقدار پتاسیم در ریشه

اثر اصلی تنش شوری و کاربرد کایتوزان در سـطح احتمـال یـک درصد روی مقدار پتاسیم ریشه معنی‌دار بودند (جدول ۴). روند تغییرات مقدار پتاسیم در ریشه نیز با افزایش شوری یک واکنش منفی را نشان می‌دهـد، بـه طـوری کـه کمتـرین مقـدار پتاسـیم در ریشـه (۰/۵۰۷ میلی‌گرم بر گرم) در تیمار ۱۲ دسی زیمنس بر متـر مشـاهده شـد. بـا افزایش کایتوزان به طور کلی مقدار یون پتاسیم در ریشه از یک رونـد افزایشی پیروی نمود اما در سطح ۰/۰۵ درصد کایتوزان بـه بیشـترین مقدار خود (۰/۶۲۵ میلی‌گرم بر گرم) رسید. به نظـر مـی‌رسـد کـاربرد کایتوزان محتوی این عنصر را در اندام‌های گیاه تغییر داد. به‌طوری‌که کاربرد کایتوزان موجب افزایش مقدار پتاسیم سـاقه نسـبت بـه شـاهد شد. گزارش شده است که کاربرد کایتوزان به‌طـور معنـی‌داری میـزان پتاسیم را در گیاهان افزایش می‌دهد (Dzung *et al.*, 2011) کـه بـا نتایج این بررسی مطابقت دارد.

نسبت سدیم به پتاسیم در ریشه

تنش شوری در سطح احتمال یک درصد توانست اثـر معنـی‌داری روی نسبت سدیم بـه پتاسـیم در ریشـه داشـته باشـد (جـدول ۴). بـا افزایش تنش شوری نسبت سدیم به پتاسیم در ریشه افزایش یافـت و بیشترین نسبت آن (۲/۰۷۵) در تیمار ۱۲ دسی‌زیمنس بر متر مشـاهده شد (جدول ۵). اما کاربرد کایتوزان اثر معنی‌داری در سطح احتمال پنج درصد روی نسبت سدیم به پتاسیم در ریشه داشت (جدول ۴) و منجر به کاهش این نسبت گردید، به طوری که کمتـرین نسـبت، همچـون کمترین نسبت سدیم به پتاسـیم در شاخسـاره، از تیمـار ۰/۰۵ درصـد کایتوزان به‌دست آمد (جدول ۵). همچون نتایج به‌دست آمده در مـورد نسبت سدیم به پتاسیم در شاخساره، نتایج به‌دست آمده در مـورد ایـن نسبت در ریشه نیز مبین تأثیر مطلوب کاربرد کایتوزان در تعـدیل اثـر مخرب یون سدیم در تیمار مورد نظر می‌باشد.

نتیجه‌گیری

نتایج آزمایش خاکی از تأثیر منفی تنش شوری بر صفات رویشی، فیزیولوژیک و یونی مطالعه شده در گیاه خارمریم می‌باشد. کاربرد نانو کایتوزان با غلظت ۰/۰۵ درصـد در مـورد صـفات زیسـت‌تـوده کـل، شاخص سطح برگ، محتوای رطوبت نسبی و شاخص پایـداری غشـا سلولی و در غلظت ۰/۰۱ درصد در مورد صفت کـارآیی فتوسیسـتم II موفق‌تر ظاهر شد. استفاده از نانو کایتوزان با غلظت ۰/۰۱ درصد منجر به کاهش یون سدیم و افزایش غلظت پتاسیم در شاخسـاره و متعاقبـاً کاهش نسبت سدیم به پتاسیم در شاخساره شـد. بـا توجـه بـه نتـایج آزمایش می‌توان کاربرد کایتوزن با غلظـت ۰/۰۱ درصـد را بـه‌عنـوان یک تعدیل‌کننده تنش شوری در کشت گیاه خارمریم معرفی نمود.

References

1. Aghighi Shahverdi, M., Omidi, H., and Mousavi, S. E. 2017. Effect of chitosan on seed germination and biochemical traits of Milk Thistle (*Silybummarianum* L.) seedling under salt stress. International Journal of Seed Research 3 (2): 105-118.
2. Amiri, A., Sirousmehr, A., and Esmaeilzadeh Bahabadi, S. 2016. Effect of foliar application of salicylic acid and chitosan on yield of Safflower (*Carthamus tinctorius* L.). Iranian journal of biology 28 (4): 712-725. (in Persian with English abstract).
3. Bittelli, M., Flury, M., Campbell, G. S., and Nichols, E. G. 2001. Reduction of transpiration through foliar application of chitosan. Agricultural and Forest Meteorology 107: 167-175.
4. Dorais, M., Papadopulos, A. P., and Gosselin, A. 2001. Influence of electrical conductivity management on greenhouse tomato yield and fruit quality. Agronomy journal 21: 367-383.
5. Dzung, N. A., Khanh, V. T. P., and Dung, T. T. 2011. Research on impact of chitosan oligomer on biophysical characteristics, growth, development and drought resistance of coffee. Carbohydrate Polymers 84: 751-755.
6. Geilfus, C. M., Zorb, C., and Muhling, H. K. 2010. Salt stress differentially affects growth-mediating bexpansins in resistant and sensitive maize (*Zea mays* L.). Plant Physiology and Biochemistry 48: 993-998.
7. Ghavami, N., Naghdy, H. A. Ramin, A. A., and Mehrafarin, A. 2011. Effect of salinity on seed yield and oil mike thistle. Journal of Medicine 2: 89-93. (in Persian with English abstract).
8. Gornik, K., Grzesik, M., and Duda, B. R. 2008. The Effect of chitosan on rooting of grapevine cuttings and on subsequent plant growth under drought and temperature stress. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research 16: 333-343.
9. Guan, Y. J., Hu, J., Wang, X. J., and Shao, C. X. 2009. Seed priming with chitosan improves maize stress

germination and seedling growth in relation to physiology changes under low temperature. Journal of Zhejiang University- Science 10: 427-433.
10. Hadrami, A. E., Adam, L. R., Hadrami, I. E., and Daayf, F. 2010. Chitosan in plant protection. Marine Drugs 8 (4): 968-987.
11. Jabeen, N., and Ahmad, R. 2013. The activity of antioxidant enzymes in response to salt stress in safflower (*Carthamus tinctorius* L.) and sunflower (*Helianthus annuus* L.) seedlings raised from seed treated with chitosan. Journal of Science Food Agriculture 93 (7): 1699-1705.
12. James, R. A., Munns, R., Caemmerer, S., Trejo, C., Miller, C., and Condou, T. 2006. Photosynthetic capacity is related to the cellular and subcellular partitioning of Na^+, K^+ and Cl^-barley and durum wheat. Plant Cell and Environment 29: 2185-2197.
13. Kalra, Y. P. 1998. Reference Methods for Plant Analysis. Soil and Plant Analysis. Boca Raton Boston London. Washington D.C. New York.
14. Khan, M. Z., Blackshaw, R. E., and Marwat, K. B. 2009. Biology of milk thistle (*Silybum marianum*) and the management options for growers in north-western Pakistan. Weed Biology Management 9: 99-105.
15. Klute, A. 1986. Methods of soil Analysis: Physical and mineralogical methods. PP 635-662 in A. Klute, A. E. Lee eds. American Society of Agronomy., Wisconsin.
16. Koca, M., Bor, M., Ozdemir, F., and Turkan, I. 2007. The effect of salt stress on lipid peroxidation, antioxidative enzymes and proline content of sesame cultivars. Environmental and Experimental Botany 60: 344-351.
17. Krause, G. H., and Weis, E. 1991. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 42: 313-349.
18. Mahdavi, B., and Safari, H. 2015. Effect of chitosan on growth and some physiological traits of chickpea under salinity stress. Plant Process and Function 4 (12): 117-127.
19. Mahdavi, B., ModarresSanavy, S. A. M., Aghaalikhani, M., and Sharifi, M. 2013. Effect of water stress and chitosan on Germination and proline of seedling in safflower (*Carthamus tinctorius* L.). Journal of Crop Improvement 25: 728-741.
20. Masomy Zvaryan, A., Yosefi Rad, M., and Moghadas, M. S. 2013. Effect of salt stress on germination indices and alpha-amylase and peroxidase enzyme activity of medicinal plants mike thistle (*Silybum marianum*). National Congress and Conventional Farming. Ardabil. (In Persian).
21. Mer, R. K., Prajith, P. K., Pandya, D. H., and Pandey, A. N. 2000. Effect of salts on germination of seeds and growth of young plants of *Hordeum vulgare*, *Triticum aestivum*, *Cicer arietinum* and *Brassica juncea*. Journal of Agronomy and Crop Science 185: 209-217.
22. Merah, O. 2001. Potential importance of water status traits for durum wheat improvement under Mediterranean conditions. Journal of Agricultural Science 137: 139-145.
23. Miyashita, K., Tanakamaru, S., Maitani, T., and Kimura, K. 2005. Recovery responses of photosynthesis, transpiration and stomata conductance in kidney bean following drought stress. Environmental and Experimental Botany 53: 205-214.
24. Mondal, M. M. A., Malek, M. A., Puteh, A. B., Ismail, M. R., Ashrafuzzaman, M., and Naher, L. 2012. Effect of foliar application of chitosan on growth and yield in okra. Australian Journal of Crop Sciences 6 (5): 918-921.
25. Munns, R. 2003. Comparative physiology of salt and water stress. Plant Cell Environment 25: 239-250.
26. Ohta, K., Asao, T., and Hosoki, T. 2001. Effects of chitosan treatments on seedling growth, chitinase activity and ower quality in *Eustoma grandiorum* (Raf.) Shinn. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology 76 (5): 612-614.
27. Ohta, K., Morishita, S., Suda, K., Kobayashi, N., and Hosoki, T. 2004. Effects of chitosan soil mixture treatment in the seedling stage on the growth and flowering of several ornamental plants. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science 73 (1): 66-68.
28. Parida, A. K., and Das, A. B. 2005. Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. Ecotoxicology and Environmental Safety 60: 324-349.
29. Poljakoff, M. A., and Lerner, H. R. 1994. Plants in saline environment. PP. 65-96. In: Pessarakli, M. (Ed.), Handbook of Plant and Crop Stress, Marcel Dekker, Inc. New York.
30. Pongprayoon, W., Roytrakul, S., Pichayangkura, R., Chadchawan, S. 2013. The role of hydrogen peroxide in chitosan-induced resistance to osmotic stress in rice (*Oryza sativa* L.). Plant Growth Regulation 70: 159-173.
31. Rabea, E. I., Badawy, M. E. T., Stevens, C. V., Smagghe, G., and Steurbaut, W. 2003. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. Biomacromolecules 4 (6): 1457-1465.
32. Ramasamy, K., and Agarwal, R. 2008. Multi targeted therapy of cancer by silymarin. Cancer Letter 269 (2): 352-62.
33. Rizza, F., Pagani, D., Stanca, A. M., and Cattivelli, L. 2001. Use of chlorophyll fluorescence to evaluate the cold acclimation and freezing tolerance of winter and spring oats. Plant Breeding 120: 389-396
34. Ruan, S. L., and Xue, Q. Z. 2002. Effects of Chitosan Coating on Seed Germination and Salt Tolerance of Seedlings in Hybrid rice (*Oryza sativa* L.). Acta Agronomica Sinica Journal 28: 803-808.

35. Shabala, S., Demidchik, V., Shabala, L., Cuin, T. A., Smith, S. J., Miller, A. J., Davies, J. M., and Newman, I. A. 2006. Extracellular Ca ameliorates NaCl induced Kloss from Arabidopsis root and leaf cells by controlling plasma membrane K-permeable channels. Plant Physiology 141: 1653-1665.
36. Sheikha, S. A. K., and AL-Malki, F. M. 2009. Growth and Chlorophyll Responses of Bean Plants to the Chitosan Applications. European Journal of Scientific Research 50: 124-134.
37. Taghipour, Z., and Maghsuddi, J. 2015. Effect of different concentrations of chitosan on germination and wheat seedling growth (*Triticum aestivum*) under drought stress conditions. Seed Research 5 (16): 65-75.
38. Uthairatanakij, A., Texeira Da Silva, G. A., and Obsuwan, K. 2007. Chitosan for improving orchid production and quality. Orchid Science and Biotechnology 1 (1): 1-5.
39. Waheed, A., Hafiz, I. A. G., Qadir, G., Murtaza, T. M., and Ashraf, M. 2006. Effect of salinity on germination, growth, yield, ionic balance and solute composition of pigeon pea (*Cajanus cajan* L.). Pakistan Journal of Botany 38: 1103-1117
40. Wei, S., Zang, X. M., Xue, J. P., and Xiang G. 2007. Effect of chitosan on seeds germination and seedling physiological property of wheat. Periodicals. Core Journals Biology Journal 24 (2): 51-53.
41. Yazdani Buick, R., Rezvani Moghaddam, P., Khazaei, H. R., Ghorbany, R., and Astaray, A. 2010. Effects of drought and salinity stress on seed germination of mike thistle. Iranian Journal of Field Crop Research 8: 12-19. (in Persian).

Iranian Journal of Field Crops Research
Vol. 16, No. 2, Summer. 2018, p. 477-491

نشریه پژوهشهای زراعی ایران
جلد ۱۶، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۷، ص. ۴۹۱-۴۷۷

Chitosan Nano-particles Application on Growth, Physiology and Mineral Element Contents of Milk thistle (*Silybum marianum*) under Salinity Stress Condition

S. Safikhan[1]- K. Khoshbakht[2*]- M. R. Chaichi[3]- A. Amini[4]- B. Motesharezadeh[5]

Received: 06-09-2017
Accepted: 10-03-2018

Introduction: Salinity stress is one of the most limiting factors in plant growth and physiological activities. To extend crop production in saline regions, application of plant promoting growth substances like Chitosan is necessary to modify the adverse effects of salinity. Milk thistle is an agro-medical plant that is familiar as a weed. However, Silymarin (which is produced by Milk thistle as a secondary metabolite) is one the most important material for treating such disease as; liver diseases, blood fat, diabetes, hepatitis, and cancer. Application of bio stimulants is one of the solutions for decreasing adverse effects of abiotic and biotic stresses on plants and increasing quality and quantity of plant yield production, so chitosan is a compound that induces defense mechanisms against stresses.

Materials and Methods: This experiment was conducted to evaluate the soil application of chitosan on vegetative, generative and physiological activities of Milk thistle in 2016. The experiment was conducted in Research Greenhouse of College of Agriculture the University of Tehran, Karaj, Iran. The experimental treatments were arranged as factorial based on a randomized complete block design (RCBD) with three replications. The first factor comprised of four saline irrigation water levels of control (Urban water with 1.2 dS m^{-1}), 4, 8 and 12 dS m^{-1} and the second factor was application of different levels of Chitosan consisting of control (without chitosan application), 0.01, 0.05, and 0.1 percent of chitosan based on 1-kilogram dry soil weight in Rhizobags. Chitosan with high molecular weight was purchased from Sigma Aldrich. 12 seeds of Milk thistle were sown in each plastic pot (23×24 cm diameter and height) containing 8.0 kg of soil, at the depth of 2 cm. After 72 days planting, plants with a uniform growth were selected for experiments. At least three plants were randomly selected from each treatment. The plant root and shoot were cut at the base and weighed to determine the dry root and shoot weight. Samples were dried at 60^{o}C for 48 hours, and their mean root and shoot dry weight were recorded for each treatment at each replicate. Also, Statistical calculations were done by SAS software, 9.1 version, and means were compared by Duncan multiple test with 5% probability.

Results and Discussion: The result showed salinity stress had significant effect on all of the growth, physiologic and ionic trait ($p \leq 0.01$). Mean comparisons in chitosan levels showed the maximum total biomass, leaf area meter, relative water content and membrane stability index were achieved with application of 0.05% nano chitosan. In 4 dS m^{-1} saline water, the highest total dry mass was obtained at 0.01% of chitosan by increasing of 21.6% compared to control ($p \leq 0.01$). In all of the salinity levels, chitosan application increased the leaf area index in compared to control (without chitosan application). The maximum leaf area index (4.264) was achieved in 0.05% chitosan concentration under non saline condition. Under 12 dS m^{-1} salinity, application 0.05% chitosan concentration decreased by 10.4% and 16.5% in sodium content and sodium potassium ration in

1- Ph.D. student in Agroecology, Department of Agroecology, Shahid Beheshti University, Environmental Sciences Research institute, Shahid Beheshti University, Evin, Tehran, Iran

2- Associated Professor of Environmental Science Research Institute (ESRI), Shahid Beheshti University, Evin, Tehran, Iran

3- Professor of Department of Crop Science, College of Agriculture, California State University, Pomona, USA

4- Associated Professor of Centre for Infrastructure Engineering, Western Sydney University, Penrith 2751, NSW, Australia

5- Associated Professor of Department of Soil Science and Engineering, College of Agriculture and Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

(*- Corresponding Author Email: kkhoshbakht@yahoo.com)

shoot, respectively. The mechanism of action of chitosan on growth is not clear. It was also found that chitosan may induce a signal to synthesize plant hormones such as gibberellins and enhance growth and development by some signaling pathway related to auxin biosynthesis. Chitosan stimulates vital processes of plants on every level of biological organization, from single cells and tissues, through physiological and biochemical processes, to changes on the molecular level related to the expression of genes. The result of the experiment demonstrated the adverse effect of salinity on growth, physiological activity, and nutrient content in Milk thistle. Application of chitosan at 0.05% (v/v) in soil could modify the adverse effect of salinity on total biomass, leaf area index, relative water content, and membrane stability index; however, 0.01% chitosan concentration was more effective on photosystem II efficiency.

Conclusions: Based on the result of this experiment, salinity stress has negative effects on growth, physiology and mineral element contents of Milk thistle. Application of 0.01% of chitosan could modify the adverse effects of irrigation water salinity on Milk thistle. Generally, application of chitosan could decrease Na^+ effects in the Milk thistle, so the rate of Na^+ in the shoot and root was decreased under high levels of salinity. The present study demonstrated that chitosan can be used as an ecofriendly compound to protect milk thistle plants as well as to enhance growth and biochemical parameters under saline water.

Keywords: Medicinal plant, Mineral elements, Relative Water Content, Saline water, Total biomass